

哺乳动物孤雌干细胞与孤雌生殖

方园¹ 柴梦佳¹ 孔庆然^{1,2} 刘忠华^{1*}

(¹东北农业大学生命科学学院黑龙江省动物细胞与遗传工程重点实验室, 哈尔滨 150030;

²温州医科大学检验医学与生命科学学院检验医学教育部重点实验室, 温州 325000)

摘要 未受精的孤雌胚胎衍生的孤雌胚胎干细胞(parthenogenetic embryonic stem cells, pESCs), 具有与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)相似的多向分化和自我更新能力, 且具备来源广泛、获取高效及低致瘤性等优势, 因此成为近年来的研究热点。该文概述了pESCs特殊的组织相容性和基因组印迹特征, 综述其在孤雌生殖等方面的应用, 并对其在遗传疾病及临床研究中的价值进行了展望。

关键词 孤雌胚胎干细胞; 组织相容性; 基因组印迹; 孤雌生殖

Parthenogenetic Stem Cells and Parthenogenesis in Mammals

FANG Yuan¹, CHAI Mengjia¹, KONG Qingran^{1,2}, LIU Zhonghua^{1*}

(¹Key Laboratory of Animal Cellular and Genetic Engineering of Heilongjiang Province, College of Life Science,

Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; ²Key Laboratory of Laboratory Medicine,

College of Laboratory Medicine and Life Science, Ministry of Education, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract As a research hotspot in recent years, pESCs (parthenogenetic embryonic stem cells) derive from unfertilized parthenogenetic embryos. pESCs not only have the similar abilities of pluripotency and self-renewal as ESCs (embryonic stem cells), but also have the advantages of wide sources, high acquisition efficiency and low tumorigenic ability. This review described the specific characteristics of pESCs in histocompatibility and genomic imprinting, and summarized its application in parthenogenesis, and prospected its value in genetic diseases and clinical research.

Keywords parthenogenetic stem cells; histocompatibility; genomic imprinting; parthenogenesis

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有在体外无限增殖、自我更新和多向分化的独特生物学特性, 并且在人类再生医学和动物生产方面的应用具有重要意义, 但是人类ESCs的建立通常会涉及受精胚胎的使用, 且由于遗传异常会导致免疫排斥, 这些问题极大限制了其在临床领域的相关研究和应用。为了解决这种困境, 研究者一直在寻找受精胚胎源ESCs(fertilized embryonic stem cells, fESCs)的

替代品。由非受精途径获得的孤雌胚胎不具备发育成为个体的可能性, 但其衍生来的孤雌胚胎干细胞(parthenogenetic embryonic stem cells, pESCs)与fESCs具有高度相似的生物学特性, 且pESCs的来源广泛, 获取方式相对简单, 成本低廉, 这使其更受研究者们青睐。更重要的是, pESCs的基因组来源于卵母细胞, 所以与卵母细胞供体具有很好的组织相容性, 患者可以选择与自身免疫源性一致的pESCs

收稿日期: 2020-08-01 接受日期: 2020-10-19

国家重点研发计划“干细胞及转化研究”项目(批准号: 2016YFA0100200)和国家自然科学基金面上项目(批准号: 31872360)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0451-55191729, E-mail: liuzhonghua@neau.edu.cn

Received: August 1, 2020 Accepted: October 19, 2020

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China-Stem Cell and Translational Research (Grant No.2016YFA0100200), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31872360)

*Corresponding author. Tel: +86-451-55191729, E-mail: liuzhonghua@neau.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5426>

治疗自身疾病和组织损伤,故pESCs是一类进行细胞替代疗法的理想资源细胞。

1 哺乳动物pESCs的建立

哺乳动物卵母细胞在没有雄性配子参与的情况下,通过化学激活或者电激活后可以发育到囊胚,分离孤雌胚胎的内细胞团可建立pESCs系。自上世纪30年代开始就已经有关于动物卵的激活与孤雌发育的相关研究,迄今为止,pESCs已成功地从小鼠、非人灵长类和人类中获得,牛、猪和兔中也有相关研究^[1-8]。1983年,KAUFMAN等^[9]利用乙醇激活小鼠的MII期卵母细胞,得到孤雌囊胚,使用胰蛋白酶分离出囊胚的内细胞团(inner cell mass, ICM)进行培养,由此建立了4株pESCs系,在将其注射进正常囊胚后发现,pESCs可以嵌合到多种组织中。2003年,LIN等^[10]采用另一种孤雌激活方法,用6-DMA-P(6-dimethylaminopurine)化学激活小鼠MII期卵母细胞获得小鼠孤雌囊胚,进而获得pESCs,此细胞系具有与卵母细胞供体相同的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC),形态及特征与fESCs相似,碱性磷酸酶和端粒酶呈阳性,表达OCT4,核型正常且具有一定的自我更新及分化的能力。

在非人灵长类孤雌干细胞的建立中,VRANA等^[11]采用不同于小鼠孤雌胚胎的激活方式,用离子霉素联合6-DMAP的方法激活了28枚MII期的短尾猴卵母细胞,获得了4枚孤雌囊胚,通过免疫手术法分离其ICM进行接种培养,衍生出了第一株稳定的猴pESCs系,将其命名为Cyno1。Cyno1细胞的克隆形态与人ESCs(human embryonic stem cells, hESCs)相似,可以在体外长期传代2年以上,具有边界明显、核质比高、核仁明显等特征。此外,其碱性磷酸酶呈阳性,表达表面标志物SSEA-4、TRA1-60和TRA1-81,在体内和体外经诱导后具有一定的三胚层分化能力。2008年,DIGHE等^[12]采用与VRANA等同样的激活方法,使38%的卵母细胞发育到了囊胚,并利用其中的17枚孤雌囊胚建立了5株恒河猴pESCs系。这些细胞系的细胞形态与ORMES(oregon rhesus monkey embryonic stem cells)细胞系相同,都具有稳定的二倍体雌性核型,并表达关键的多能性标记OCT4、SSEA-3、SSEA-4、TRA1-60和TRA1-81,在体内和体外均可衍生成三胚层细胞。

小鼠和非人灵长类pESCs系的成功建立,激励研究者们建立人的pESCs。2004年,韩国学者曾自称建立了世界上第一株人体细胞克隆ESCs系^[13],后来KIM等^[14]证实该细胞系应是世界上第一株人pESCs系。之后,研究者人工激活了104枚人卵母细胞并获得人孤雌囊胚,随后建立出2株人pESCs系,并且证明这些pESCs具有与fESCs相似的特性^[15]。在这一系列研究中,孤雌胚胎都是在高氧(20%)环境中培育^[13-15],而高氧会诱导细胞凋亡,因此能在体外低氧条件下培育孤雌胚胎并使其发育到囊胚阶段成为了技术进步的关键。2007年,REVAZOVA等^[16]使用含5%氧气的混合气体培养胚胎,大幅提高了孤雌囊胚的形成率。同时,该研究利用人皮肤成纤维细胞代替小鼠成纤维细胞作为饲养层细胞,人脐带血清代替动物血清,并优化了孤雌胚胎ICM的分离方法,仅用23枚人的孤雌胚胎就建立了6株人pESCs系。这些细胞系具有典型的hESCs特征,克隆紧密、核仁突出、核质比高,表达hESCs的标记SSEA-3、SSEA-4、TRA1-60、TRA1-81和OCT4,不表达小鼠ESCs标记SSEA-1,碱性磷酸酶和端粒酶活性较高,可稳定传代30代以上,体内和体外都具有三胚层分化能力,并且与卵母细胞供体的MHC相匹配^[16]。

干细胞在体外能否被长期培养以及在连续传代扩增条件下能否维持染色体结构的稳定性,这对于临床应用的安全性高低至关重要。2007年,MAI等^[3]对人卵母细胞连续进行电刺激和化学药剂刺激,激活了16枚卵母细胞,建立了2株人pESCs系。该细胞系在体外连续增殖超过100代后,其中一个细胞系仍保持正常的46XX核型,具有典型的ESCs形态和特征,在体内和体外都具有三胚层分化潜能。短串联重复序列(short tandem repeat, STR)检测结果表明,该pESCs系与卵供体遗传匹配^[3]。以上结果证明,分离和建立人pESCs系是可行的,这为表观遗传修饰的研究及在临床中进行治疗性干预提供了重要的工具。

2 pESCs的组织相容性

pESCs的基因组与卵母细胞供体同源,与其具有良好的组织相容性,在基于干细胞的治疗方法中,pESCs可能比双亲ESCs的免疫排斥风险更低,这可能有助于细胞系与患者之间的匹配,从而更适合于细胞或组织的替代治疗,为医学临床上的医学顽症,如帕金森综合征(Parkinson's disease, PD)、脊髓损

伤、肌肉萎缩、粥样硬化、糖尿病等提供了新的治疗希望。ESCs及其分化后的功能细胞表达MHC(或human leukocyte antigen, HLA), 移植到宿主体内后可能因MHC不相容而刺激机体引起免疫排斥反应, 导致移植治疗失败。其中, 人体组织器官移植最为相关的抗原是HLA-A、HLA-B和HLA-DR。通常在临床上, 供体与受体之间会尽量匹配这三个位点, 以提高器官移植和细胞移植后的移植存活率。

由于不同的激活方法会导致同源的孤雌胚胎的核型产生差异。孤雌激活MII期卵母细胞抑制第二极体排出并与原核相融合, 保留姐妹染色单体, 形成杂合二倍体胚胎, 建立出的pESCs为杂合型(图1A)。卵母细胞第二极体排出后可形成单倍体孤雌胚胎, 在早期有丝分裂期间染色体经过核内复制后单倍体孤雌胚胎可发育成二倍体胚胎, 由此胚胎建立的pESCs的遗传物质是由单倍染色体复制而来的, 为纯合型pESCs(图1B)。作为具有免疫相容性的细胞, 杂合型pESCs的特殊优势是可支持自体移植。利用STR对来自同一雌性恒河猴的3株pESCs(rPESC)系进行杂合性分析, 发现rPESC-1、rPESC-2和rPESC-3与供体卵母细胞相同的基因座同源率分别为87.2%、69.2%和71.8%^[12]。这种高杂合度产生的原因可能是在第一次减数分裂早期, 父母同源染色体等位基因之间发生同源重组, 尤其是远离着丝粒的染色体位置容易发生交换。因此, 染色体复制后形成的姐妹染色单体上的等位基因不一定相同, 即使在正常受精情况下也会发生染色体交叉互换的情况(图1C)。维持MHC(或HLA)区域内的杂合性对pESCs来说是十分关键的, 它可以避免受体对缺失等位基因的免疫识别^[17]。例如, rPESC-1细胞系与卵母细胞供体位于该区域的两个等位基因完全匹配。而rPESC-2细胞系在该区域是纯合的, 其中一组等位基因的缺失可能会引起自然杀伤(natural killer, NK)细胞的免疫应答。因此, 在自体移植过程中, 应分析人pESCs系的杂合性, 特别是在HLA位点区域, 以确保自体组织相容性移植的最佳匹配。此外, 杂合的pESCs可能是研究人类雌性种系重组的有用工具。通过全基因组单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)或STR基因分型可以确定姐妹染色单体交换区域^[17]。

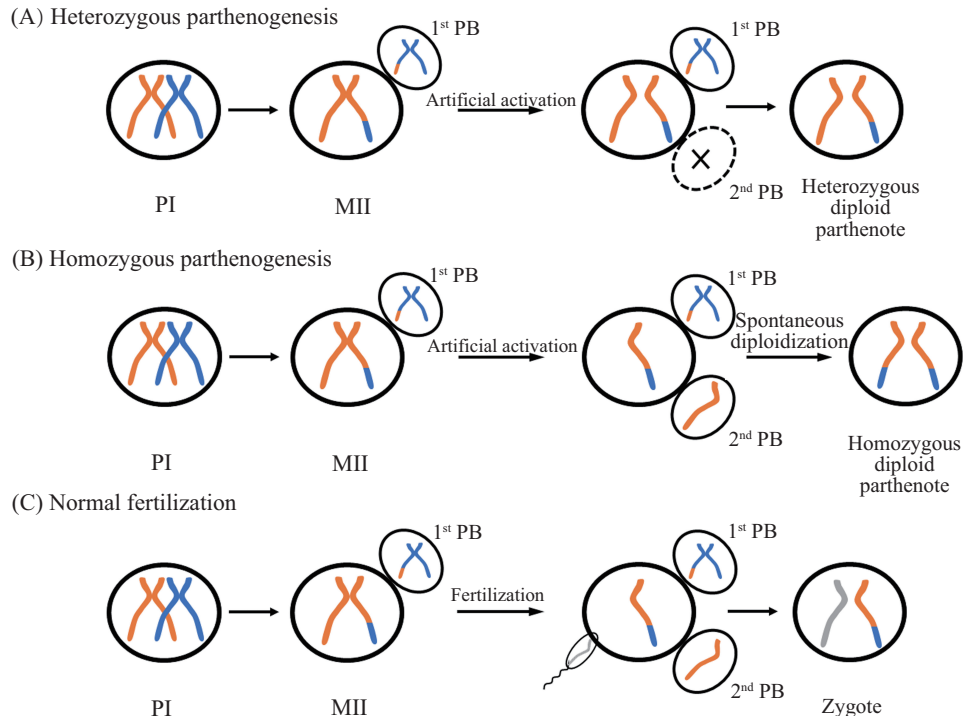
纯合型pESCs在异体移植中对免疫排斥反应具有独特优势。至少有两种可能的方法来获得人HLA

位点纯合的pESCs: 第一种是从HLA位点纯合卵母细胞捐献者那里获得人HLA纯合干细胞系, 但这类捐献者在人群中极为稀少; 第二种方法是从HLA位点杂合的卵母细胞供体中分离HLA纯合的pESCs。人HLA等位基因具有丰富的多样性, 估计在12个不同的位点上存在超过1 500种组合^[18]。HLA多样性及结合杂合选择系数, 意味着大量的由杂合个体中等位基因变异组合所提供的独特组织类型, 找到供体-受体匹配的几率在千分之一到几百万分之一之间, 因此, 为预期的患者建立足够的干细胞库是一个艰巨的挑战。然而, HLA位点纯合的pESCs可以作为HLA半匹配的供体细胞, 相对于HLA非纯合的hESCs系, 能够满足更多无血缘个体的配型需求, 因此, 建立HLA纯合的pESCs细胞库更为可行。例如, 假设850个随机提取的ESCs株系可以在3个避免免疫排斥反应关键的位点(HLA-A、HLA-B和HLA-DR)匹配60%的患者, 而仅55个随机抽取的纯合pESCs系就可以在这些关键位点匹配80%的患者^[19-20]。

虽然纯合型pESCs作为异体移植供体细胞具有一定的免疫配型优势, 但是它们在未来临床使用之前, 必须先解决NK细胞的免疫应答反应, NK细胞可以检测到pESCs在宿主体内的抗原水平并对其作出反应, 包括pESCs中宿主抗原的缺乏^[17,21]。当HLA纯合的异体移植细胞移植到HLA杂合的个体上时, 可能由于移植细胞中等位基因的缺失使得移植受体产生NK细胞的免疫应答。然而, 在小鼠的研究中表明, 当将MHC纯合的pESCs和其拟胚体注射到MHC杂合的小鼠中时, 宿主小鼠不会发生免疫排斥反应。相反, 当MHC杂合的pESCs和其拟胚体移植到MHC部分不匹配的宿主中时, MHC表现为部分错配和不耐受^[22]。简单地说, MHC a/a可以移植到MHC a/b的宿主体内, 但MHC a/b在MHC a/a小鼠中的存活率较低。这一结果是令人兴奋的, 但人类在HLA位点上有更多的多态性, 这使得其在免疫耐受的应用中更加复杂。

3 pESCs与基因组印迹

基因组印迹是一种表观遗传机制, 可导致某些基因的表达仅来自两个亲本染色体中的一个。印迹是在配子形成过程中被建立的, 在胎儿生长发育中发挥重要作用。自然条件下, 由于基因组印迹的存在, 哺乳动物的孤雌生殖无法获得出生动物。在人



A: 没有完成减数分裂的杂合孤雌生殖。人工激活后, 阻止第二极体排出, 姐妹染色单体分离后这两条染色单体被保留在卵母细胞内, 形成二倍体孤雌受精卵。第一次减数分裂早期父母同源染色体等位基因之间发生交叉互换, 产生的二倍体孤雌胚胎表现出高水平的杂合性。B: 减数分裂完成后的纯合孤雌生殖。人工激活可能不会干扰减数分裂和第二极体分离的完成。然而, 最初的单倍体基因组在有丝分裂的S期复制, 而没有进行后续的细胞分裂。两个姐妹染色单体保留为同源对, 产生二倍体但纯合的孤雌胚胎。C: 正常受精。在减数分裂的MI期, 两个亲本染色体, 每个包含姐妹染色单体, 通过染色体交叉重新结合和交换区域。减数分裂MI期结束时将一个同源亲本染色体挤压到第一极体中。剩余的同源染色体进入减数分裂MII期, 但在MII中期停留, 直到被精子受精。受精后减数分裂继续进行。姐妹染色单体分离, 其中一条染色单体在第二极体中被消除。精子为二倍体合子提供第二个同源染色体。MII, 减数分裂中期; PB, 极体; PI, 减数分裂前期。

A: heterozygous parthenogenesis without completion of meiosis. After artificial activation that blocks second PB extrusion, sister chromatids segregate during anaphase II; however, both chromatids are retained within the oocyte, forming a diploid parthenogenetic zygote. Because of earlier meiotic recombination and crossover with the other homologous parental chromosomes, the resulting diploid parthenote exhibits high levels of heterozygosity. B: homozygous parthenogenesis after completion of meiosis. Artificial activation methods may not interfere with completion of meiosis and segregation of the second PB. However, the initial haploid genome replicates during mitotic S-phase without undergoing subsequent cell division. Both sister chromatids are retained as a homologous pair resulting in a diploid but homozygous parthenote. C: normal fertilization. During the prophase I of meiosis I, the two parental chromosomes, each containing sister chromatids, recombine and exchange regions through chromosomal crossover. Meiosis I is resolved by extrusion of one homologous parental chromosome into the first polar body. The remaining homologous chromosome enters into meiosis II but remains arrested at metaphase II until fertilized by sperm. Meiotic progression resumes after fertilization. Sister chromatids segregate, and one chromatid is eliminated in the second PB. The sperm provides the second homologous chromosome to the diploid zygote. MII, metaphase II; PB, polar body; PI, prophase I of meiosis I.

图1 孤雌生殖期间的减数分裂和合子结果

Fig.1 Meiosis and zygosity outcomes during parthenogenesis

类和许多哺乳动物中, 母本和父本基因组在数量上是相同的, 但在功能上是不同的, 母本和父本基因组是互补的并且它们对于正确的生长过程都是必不可少的, 两套基因组都是哺乳动物发育所必需的^[23]。基因组印迹的建立是由DNA甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA和专门的染色质结构控制的。等位基因的特异性DNA甲基化被认为是调节基因组印迹的主要因素。亲本来源的差异甲基化区域(differentially methylated region, DMR)的特异性DNA甲基化可以

区分父源和母源的等位基因, 并导致印迹基因的单等位基因表达^[24]。

印迹研究的关键进展来自于单亲本细胞的使用, 它能够在分子水平及遗传功能上系统地分离亲本背景下的亲源效应。对pESCs和fESCs印迹的比较研究为了解亲代印迹的特性提供了很好的机会。父源表达的印迹基因在pESCs中的表达模式类似于fESCs。pESCs的体内多能性与印迹基因的表现遗传重编程密切相关。与fESCs一样, pESCs产生嵌合

体的效率很高, 在嵌合细胞中, pESCs对组织或器官的贡献从传代早期到传代中期增加, 随后在传代晚期效率下降。在体外长期培养过程中, 印迹基因在传代早期、中期和晚期的表达也发生了变化。母源表达的印迹基因(*H19*和*Gtl2*)和父源表达的印迹基因(*Dlk1*、*Snrpn*、*Peg1*和*U2af1-rs1*) 在传代早期至中晚期表达增加, 后期表达减少; 母源表达的印迹基因*Igf2r*在中期表达减少, 在晚期表达增加^[25]。在体外培养过程中, 印迹基因的甲基化也不稳定。*Igf2r*和*Snrpn*, 特别是*U2af1-rs1*的DMR甲基化与pESCs对嵌合的贡献率呈高度负相关。仅激活父源表达的印迹基因可能不足以确保pESCs对嵌合体的高贡献, 某些母源表达的印迹基因的表达降低也是提高pESCs多能性的必要条件。失去母源甲基化印迹而获得更正常的印迹模式和高多能性的pESCs系, 为研究印迹在哺乳动物发育中的表观遗传调控提供了有价值的模型。

孤雄胚胎干细胞 (androgenetic embryonic stem cells, aESCs)、pESCs和fESCs代表了在相同细胞类型和分化状态下不同亲本背景的发生。这些细胞之间的差异很可能是由印迹引起的, 比较它们可以识别出人类基因组中以前未描述的印迹基因和区域。SAGI等^[26]建立了一个具有不同亲本来源的人ESCs系的多能细胞系统, 包括新衍生的所有父系的aESCs、所有母系的pESCs和相关的ESCs。在这个系统中, 印迹基因原则上应该显示唯一的表达特征。相对于fESCs, 母源表达基因在aESCs中显著下调, 在pESCs中大约上调2倍, 同样, 在pESCs中父源表达基因显著下调, 在aESCs中大约上调2倍。在此之前, STELZER等^[27-28]比较了人孤雌诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 和双亲本多能干细胞, 鉴定出了一些已知和未知的在孤雌生殖细胞中显著下调的父源表达基因。SAGI等^[26]的实验中加入全父本的人aESCs为检测印迹基因提供了更高的分辨率。人孤雌生殖细胞的应用可使研究人员进一步分析由父本和母本基因组调控的相关基因及其表达过程, 从而提高对这一现象所涉及的表现遗传过程的理解。

4 pESCs与孤雌生殖

哺乳动物孤雌胚胎无法长期发育, 并死于基因组印迹缺陷。pESCs是在体外从孤雌囊胚的ICM中分

离和培养出来的, 可以逃避体内调节其发育的因素, 包括印迹。因此, 基因组印迹对来自孤雌胚胎来源的pESCs的影响可能小于孤雌胚胎本身。在正常受精的植入前小鼠胚胎中*H19*不表达, *Igf2*表达。用未生长卵母细胞的核和成熟卵母细胞的胞质构建的孤雌胚胎, 由于*H19*和*Igf2*基因的印迹没有发生重编程, 只能发育到13.5天^[29]。*H19*的双等位基因表达和/或*Igf2*的沉默导致了孤雌胚胎的发育阻滞。在小鼠中, 有意的基因操作可以绕过发育障碍完成足月的孤雌生殖。2004年, KONO等^[30]利用*H19*基因单敲除未生长卵母细胞的细胞核作为供体, 获得了发育成熟的孤雌小鼠, 这种孤雌小鼠*Igf2*和*H19*表达正常, 并具有繁殖后代的能力, 表明*H19*-DMR(*H19*上游差异甲基化区域)控制的印迹基因群对于胚胎的发育起到重要作用^[31]。然而, 还有许多阻碍单亲生殖的障碍存在。例如, 从父亲遗传的*Dlk1-Dio3*印迹区域对于双父本胚胎的发育是必不可少的, 但对于双母本胚胎则不是必需的。KONO等^[32]在之后的研究中同时单敲除了*H19*-DMR和*IG*-DMR(the intergenic-DMR, 位于*Dlk1-Dio3*间的差异甲基化区域), 大幅度提高了孤雌胚胎发育到期的比率。KONO^[32]的研究表明, 仅纠正几个印迹区域就足以挽救孤雌发育。另外, 获得的孤雌小鼠体重较轻, 但寿命比对照组的雌性小鼠长约30%, 这表明父系印迹可能调节寿命和能量保存。尽管去除两个父系印迹区域可以使双母本小鼠正常发育, 但哺乳动物孤雌动物仍可能存在其他对后代有害的表现遗传异常。

来自孤雌胚胎的pESCs能够产生嵌合体, 但是乙醇激活卵母细胞建立的pESCs, 在小鼠中表现出有限的发育潜力。相比之下, 在氯化锶的刺激下, 卵母细胞可以达到与受精作用类似的激活状态, 显著增强孤雌胚胎发育效率。从完全激活的卵母细胞中建立pESCs, 可以提高pESCs的多能性。2009年, CHEN等^[33]用氯化锶激活建立了新的pESCs系, 其印迹基因的表达状态与fESCs相似, 这些pESCs在体外表达了典型的fESCs的分子标记, 与fESCs对组织/器官的贡献没有区别。令人惊讶的是, 通过四倍体胚胎互补 (tetraploid embryos complementation, TEC), 这些pESCs可以不经基因修饰而产生活的孤雌生殖幼仔, 表明pESCs具有足月发育能力, 可以分化为体内所有的细胞类型和功能器官。该细胞系中*Igf2r*的表达水平与在fESCs中相当, *H19*的表

达显著降低, 体外培养改变了pESCs中印迹基因的表达, 解释了为什么pESCs能通过TEC进行足月发育。LI等^[34]根据KONO等的实验推测, 将*H19*-DMR与*IG*-DMR的一个等位基因敲除也可以大幅度提高pESCs的多能性。他们利用CRISPR/Cas9系统敲除pESCs中的*H19*-DMR与*IG*-DMR的单等位基因, 修饰后的pESCs的发育潜能有所提高, 通过TEC获得了发育到期的孤雌胎儿, 具备四倍体补偿能力即可以证明pESCs可以分化到个体的任一类型细胞, 为将来pESCs的应用奠定理论基础。

利用未生长的卵母细胞, 通过印迹修饰, 获得孤雌动物的方法在技术上具有挑战性。而近些年来, 研究者们已成功地在小鼠、大鼠、猴子和人类中建立了孤雌单倍体胚胎干细胞(parthenogenetic haploid embryonic stem cells, phESCs), 并为基因筛选和动物生产提供了新的平台^[35-38]。这些phESCs保持单倍体状态并具有三胚层分化能力, 包括体外和体内的生殖细胞。2016年, LI等^[39]通过将*H19*-DMR和*IG*-DMR的双敲除的孤雌单倍体ESCs(2KO-phESCs)注入成熟卵母细胞中生产孤雌小鼠, 孤雌小鼠发育到期成活率大幅提高, 并证明*IG*-DMR的缺失是必不可少的。但获得的孤雌小鼠大多表现出生长发育阻滞、体重较轻和行动迟缓的现象。因此, LI等^[40]在随后研究中进一步删除phESCs中*Rasgrfl*的印迹区域, 并获得了KO的孤雌小鼠, 这种孤雌小鼠并没有显示出生长迟缓或其他异常。因此, 可能需要编辑更多的关键印迹基因才可能进一步提高pESCs的发育潜能, 并最终获得正常健康的孤雌成体动物。

5 讨论与展望

当前, 孤雌激活是获得人pESCs的一种有效途径, pESCs具有来源广泛、获取高效及低致瘤性等优势, 并具有与ESCs和iPSCs相似的生物学特性^[41]。在临床治疗上, 患者特异性的iPSCs或体细胞核移植来源的ESCs(somatic cell nuclear transfer derived ESCs, SCNT-ESCs)是十分昂贵的, 大多数患者可能无法承担, 而且iPSCs和SCNT-ESCs的遗传物质来源于体细胞, 可能存在年龄获得性突变, 因此, 其遗传完整性尚不清楚^[42-43], 而pESCs直接来源于基因组稳定的卵母细胞, 并且人pESCs在体外可诱导分化为多种功能细胞。AHMAD等^[44]的结果证实了人pESCs的神

经分化潜能, 人pESCs可以产生具有增殖能力的人源孤雌神经干细胞(human pESCs-derived neural stem cells, hpNSCs), hpNSCs不仅可以进一步分化为早期神经细胞谱系, 而且还可以分化为成熟的神经和胶质细胞类型。GONZALEZ等^[45-46]首次在啮齿类动物和非人灵长类动物模型中移植hpNSCs, 移植后的动物体内多巴胺(dopamine, DA)水平升高, 没有任何不良反应, 证明hpNSCs安全性、耐受性好, 可能成为PD细胞治疗的潜在来源。在视网膜变性大鼠模型中, 来源于hESCs的视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)可以恢复视觉功能。2012年, LI等^[47]将人pESCs成功分化为RPE样细胞, 为人RPE细胞的移植治疗带来希望。选择组织相容性的pESCs进行分化移植更有利于其在再生医学中的应用, 建立中等规模的HLA纯合的pESCs细胞库即可为数十万甚至数百万人提供兼容细胞^[22]。pESCs的单亲本起源和不对称印迹也使其成为研究早期胚胎发育机制和遗传印迹的宝贵模型。然而, 异常的印迹和高水平的纯合性可能使pESCs在再生医学中的应用复杂化。显然, 每种多能性干细胞都有其独特的优点和缺点。在细胞治疗的背景下, 对人pESCs效用的研究应该与不同类型的多能性干细胞的结果进行比较和评估。

近几十年来, 从不同的哺乳动物中成功建立pESCs, 从筛选MHC匹配的pESCs供体用于移植, 到利用pESCs鉴定未知的印迹基因, 再到基因编辑pESCs产生孤雌动物, 研究者在pESCs和孤雌生殖的研究方面越来越深入, 这对人类基因疾病的研究产生了巨大影响。哺乳动物同性生殖的成功, 为人们提供了一种新的动物繁育手段, 这种手段可以用来培育具有较高科研和医学价值的纯系动物。而且, 在孤雌动物中, 针对不同印迹区域所做的遗传操作可以修复一定的单亲生殖障碍, 能够为以后这类疾病的临床治疗提供极具价值的先期探索。但是, 当前pESCs的建立多集中于小鼠、非人灵长类和人中, 孤雌动物的研究也局限在小鼠当中。在其他哺乳动物中并未建立真正的pESCs, 特别是对人器官移植有潜在应用的猪的pESCs的研究还不够充分。在大型哺乳动物中建立pESCs和获得孤雌动物有助于了解哺乳动物生殖方式的优劣、应对未来潜在的疾病威胁, 有利于细胞替代治疗在临床应用方面的发展。

参考文献 (References)

- [1] BREVINI T A, PENNAROSSA G, ANTONINI S, et al. Parthenogenesis as an approach to pluripotency: advantages and limitations involved [J]. *Stem Cell Rev*, 2008, 4(3): 127-35.
- [2] CIBELLI J B, GRANT K A, CHAPMAN K B, et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates [J]. *Science*, 2002, 295(5556): 819.
- [3] MAI Q, YU Y, LI T, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts [J]. *Cell Res*, 2007, 17(12): 1008-19.
- [4] UH K J, PARK C H, CHOI K H, et al. Analysis of imprinted *IGF2/H19* gene methylation and expression in normal fertilized and parthenogenetic embryonic stem cells of pigs [J]. *Anim Reprod Sci*, 2014, 147(1/2): 47-55.
- [5] MAI Q, MAI X, HUANG X, et al. Imprinting status in two human parthenogenetic embryonic stem cell lines: analysis of 63 imprinted gene expression levels in undifferentiated and early differentiated stages [J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(6): 430-9.
- [6] BEVACQUA R J, FERNANDEZ-MARTIN R, SALAMONE D F. Bovine parthenogenotes produced by inhibition of first or second polar bodies emission [J]. *Biocell*, 2011, 35(1): 1-7.
- [7] FANG Z F, GAI H, HUANG Y Z, et al. Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(18): 3669-82.
- [8] JUNG S K, KIM H J, KIM C L, et al. Enhancing effects of serum-rich and cytokine-supplemented culture conditions on developing blastocysts and deriving porcine parthenogenetic embryonic stem cells [J]. *J Vet Sci*, 2014, 15(4): 519-28.
- [9] KAUFMAN M H, ROBERTSON E J, HANDYSIDE A H, et al. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1983, 73: 249-61.
- [10] HELEN L, LEI J, DAVID W, et al. Multilineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(2): 152-61.
- [11] VRANA K E, HIPPI J D, GOSS A M, et al. Nonhuman primate parthenogenetic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(Suppl 1): 11911-6.
- [12] DIGHE V, CLEPPER L, PEDERSEN D, et al. Heterozygous embryonic stem cell lines derived from nonhuman primate parthenotes [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(3): 756-66.
- [13] HWANG W S, RYU Y J, PARK J H, et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst [J]. *Science*, 2004, 303(5664): 1669-74.
- [14] KIM K, NG K, RUGG-GUNN P J, et al. Recombination signatures distinguish embryonic stem cells derived by parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3): 346-52.
- [15] MARCHANT J. Human eggs supply 'ethical' stem cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7097): 1038.
- [16] REVAZOVA E S, TUROVETS N A, KOCHETKOVA O D, et al. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts [J]. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(3): 432-49.
- [17] KIM K, LEROU P, YABUUCHI A, et al. Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis [J]. *Science*, 2007, 315(5811): 482-6.
- [18] RAO M S, AUERBACH J M. Estimating human embryonic stem-cell numbers [J]. *Lancet*, 2006, 367(9511): 650.
- [19] BRAY R A, HURLEY C K, KAMANI N R, et al. National marrow donor program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008, 14(9 Suppl): 45-53.
- [20] NAKAJIMA F, TOKUNAGA K, NAKATSUJI N. Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(4): 983-5.
- [21] HOGLUND P, SUNDBACK J, OLSSON-ALHEIM M Y, et al. Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse [J]. *Immunol Rev*, 1997, 155: 11-28.
- [22] DIDIE M, CHRISTALLA P, RUBART M, et al. Parthenogenetic stem cells for tissue-engineered heart repair [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(3): 1285-98.
- [23] GARFIELD A S, COWLEY M, SMITH F M, et al. Distinct physiological and behavioural functions for parental alleles of imprinted *Grb10* [J]. *Nature*, 2011, 469(7331): 534-8.
- [24] GOSDEN R, TRASLER J, LUCIFERO D, et al. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology [J]. *Lancet*, 2003, 361(9373): 1975-7.
- [25] LI C, CHEN Z, LIU Z, et al. Correlation of expression and methylation of imprinted genes with pluripotency of parthenogenetic embryonic stem cells [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(12): 2177-87.
- [26] SAGI I, DE PINHO J C, ZUCCARO M V, et al. Distinct imprinting signatures and biased differentiation of human androgenetic and parthenogenetic embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(3): 419-32, e9.
- [27] STELZER Y, BAR S, BARTOK O, et al. Differentiation of human parthenogenetic pluripotent stem cells reveals multiple tissue- and isoform-specific imprinted transcripts [J]. *Cell Rep*, 2015, 11(2): 308-20.
- [28] STELZER Y, YANUKA O, BENVENISTY N. Global analysis of parental imprinting in human parthenogenetic induced pluripotent stem cells [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(6): 735-41.
- [29] KONO T, OBATA Y, YOSHIMIZU T, et al. Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse [J]. *Nat Genet*, 1996, 13(1): 91-4.
- [30] KONO T, OBATA Y, WU Q, et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood [J]. *Nature*, 2004, 428(6985): 860-4.
- [31] LIN S P, YOUNGSON N, TAKADA S, et al. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the *Dlk1-Gtl2* imprinted cluster on mouse chromosome 12 [J]. *Nat Genet*, 2003, 35(1): 97-102.
- [32] KONO T. Genomic imprinting is a barrier to parthenogenesis in mammals [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2006, 113(1/2/3/4): 31-5.
- [33] CHEN Z, LIU Z, HUANG J, et al. Birth of parthenote mice directly from parthenogenetic embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(9): 2136-45.
- [34] LI X, PENG K, ZHANG J, et al. Imprinting genes modified parthenogenetic embryonic stem cells produce full-term mouse via tetraploid complementation [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue*

- Bao, 2019, 35(5): 910-8.
- [35] WANG H, ZHANG W, YU J, et al. Genetic screening and multipotency in rhesus monkey haploid neural progenitor cells [J]. *Development*, 2018, doi: 10.1242/dev.160531.
- [36] HIRABAYASHI M, HARA H, GOTO T, et al. Haploid embryonic stem cell lines derived from androgenetic and parthenogenetic rat blastocysts [J]. *J Reprod Dev*, 2017, 63: 611-6.
- [37] ZHONG C, ZHANG M, YIN Q, et al. Generation of human haploid embryonic stem cells from parthenogenetic embryos obtained by microsurgical removal of male pronucleus [J]. *Cell Res*, 2016, 26(6): 743-6.
- [38] WUTZ A. Haploid mouse embryonic stem cells: rapid genetic screening and germline transmission [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 705-22.
- [39] LI Z, WAN H, FENG G, et al. Birth of fertile bimaternal offspring following intracytoplasmic injection of parthenogenetic haploid embryonic stem cells [J]. *Cell Res*, 2016, 26(1): 135-8.
- [40] LI Z K, WANG L Y, WANG L B, et al. Generation of bimaternal and bipaternal mice from hypomethylated haploid ESCs with imprinting region deletions [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(5): 665-76.e4.
- [41] LIU Y, YE X, MAO L, et al. Transplantation of parthenogenetic embryonic stem cells ameliorates cardiac dysfunction and remodelling after myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 97(2): 208-18.
- [42] YOUNG M A, LARSON D E, SUN C W, et al. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(5): 570-82.
- [43] ABYZOV A, MARIANI J, PALEJEV D, et al. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2012, 492(7429): 438-42.
- [44] AHMAD R, WOLBER W, ECKARDT S, et al. Functional neuronal cells generated by human parthenogenetic stem cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42800.
- [45] GONZALEZ R, GARITAONANDIA I, CRAIN A, et al. Proof of concept studies exploring the safety and functional activity of human parthenogenetic-derived neural stem cells for the treatment of Parkinson's disease [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(4): 681-90.
- [46] GONZALEZ R, GARITAONANDIA I, POUSTOVOITOV M, et al. Neural stem cells derived from human parthenogenetic stem cells engraft and promote recovery in a nonhuman primate model of Parkinson's disease [J]. *Cell Transplant*, 2016, 25(11): 1945-66.
- [47] LI W B, ZHANG Y S, LU Z Y, et al. Development of retinal pigment epithelium from human parthenogenetic embryonic stem cells and microRNA signature [J]. *Invest Ophth Vis Sci*, 2012, 53(9): 5334-43.